

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-107954

(43)公開日 平成9年(1997)4月28日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 15/09			C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
// (C 1 2 N 1/21				

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-291859	(71)出願人	594206705 株式会社エイチ・エス・ビー研究所 大阪市中央区道修町2丁目2番8号
(22)出願日	平成7年(1995)10月13日	(71)出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
		(72)発明者	石井 俊輔 茨城県稲敷郡阿見町南平台1丁目16番9号
		(72)発明者	由良 隆 京都市左京区修学院狭間町12
		(74)代理人	弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 細菌により可溶性蛋白質を生産する方法

## (57)【要約】

【解決手段】 T7プロモーター等の制御下に発現するチオレドキシン遺伝子の発現ベクターとインターフェロン等の目的遺伝子の発現ベクターにより形質転換されてなる共形質転換細菌、および該共形質転換細菌を用いて、目的遺伝子がコードする蛋白質を可溶性蛋白質として発現させることを特徴とする可溶性蛋白質の生産方法。

【効果】 本発明により、従来不溶性蛋白質としてしか細菌中では発現されなかった真核生物の蛋白質を可溶性蛋白質として発現させることが可能となった。また、一部可溶性蛋白質として発現されていた真核生物蛋白質の可溶性蛋白質の割合を増加させることが可能となった。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 チオレドキシン遺伝子の発現ベクターと目的遺伝子の発現ベクターにより形質転換されてなる共形質転換細菌。

【請求項2】 チオレドキシンが、大腸菌のチオレドキシン、ヒトのチオレドキシン、グルタレドキシン、またはプロテインジスルフィドイソメラーゼのチオレドキシン様ドメインである請求項1記載の共形質転換細菌。

【請求項3】 チオレドキシン遺伝子の発現ベクターが、T7プロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、trpプロモーター、λPLプロモーター、araプロモーターのいずれかの制御下にチオレドキシン遺伝子の発現を可能とするものである請求項1または請求項2記載の共形質転換細菌。

【請求項4】 目的遺伝子が、インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン受容体、インターロイキン受容体拮抗物質、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、トロポエチン、白血病抑制因子、幹細胞成長因子、腫瘍壊死因子、成長ホルモン、プロインスリン、インスリン様成長因子、繊維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、トランスフォーミング成長因子、肝細胞成長因子、骨形成因子、神経成長因子、毛様体神経栄養因子、脳由来神経栄養因子、グリア細胞由来神経栄養因子、ニューロトロフィン、ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、血液凝固因子、プロテインC、グルコセレブロシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、レニン、リゾチーム、P450、プロキモシン、トリプシンインヒビター、エラスターゼインヒビター、リポコルチン、免疫グロブリン、1本鎖抗体、補体成分、血清アルブミン、ウイルス構成蛋白質、プロトオンコジーン産物、および転写調節因子からなる群より選択されるものである請求項1～請求項3いずれか1項記載の共形質転換細菌。

【請求項5】 請求項1～請求項4いずれか1項記載の共形質転換細菌を用いて、目的遺伝子がコードする蛋白質を可溶性蛋白質として発現させることを特徴とする可溶性蛋白質の生産方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、チオレドキシン遺伝子の発現ベクターと目的遺伝子の発現ベクターとにより共形質転換された細菌、および通常菌体内に不溶性蛋白質、例えばいわゆる封入体(inclusion body)として発現される遺伝子産物を前記の共形質転換細菌を用いて可溶性蛋白質として発現させることによる可溶性蛋白質の生産方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】大腸菌は容易に高密度に増殖し、しかも

宿主ベクター系の研究が最も進んでおり、多くの高発現ベクターが開発されるなど、異種蛋白質を安価にかつ収率よく生産するための宿主として最適であることから、大腸菌の宿主ベクター系は異種遺伝子の発現系として最も広く利用されている。しかし、多くの異種蛋白質、特に真核生物蛋白質は大腸菌内で高発現させると、細胞質内で会合し生物学的に不活性な不溶性の封入体と呼ばれるアグリゲートを形成する。封入体の形成は、発現蛋白質を宿主菌体内の蛋白質分解酵素による分解から保護し、また遠心分離により菌体から容易に分離することを可能ならしめるという利点を持つが、目的である生物学的に活性な蛋白質を得るためには、封入体を変性可溶化した後、再生(リフォールディング)する必要がある。この可溶化・再生の操作は、個々の蛋白質ごとに試行錯誤を繰り返し経験的に行われているが、満足な回収率が得られないことが多いばかりか、必ずしも再生できるとは限らず、この点が大きな課題となっている。大腸菌では、糖鎖の付加などの翻訳後修飾が困難であることとあわせて、これらのことが蛋白質生産における大腸菌宿主ベクター系のひとつの限界とされてきた。その後、生物学的に活性な蛋白質の発現が可能な動物細胞を宿主とする発現系が注目され急速に発展したが、安価に高収率で蛋白質を大量生産させることが難しく、限られた種類の蛋白質の生産に利用されるにとどまっているのが現状である。したがって、大腸菌により生物学的に活性な可溶性蛋白質として発現させる技術を確認することは、有用蛋白質の大量生産という産業上の大きな課題であると共に、蛋白質の構造研究といった研究の分野においても克服すべき重要な課題となっている。

【0003】蛋白質が不溶化されるメカニズムは知られていない。封入体の形成はポリペプチドの適切なフォールディング(折り畳み)が欠如しているために起こる不適当な蛋白質-蛋白質相互作用によると考えられる(Schein, C. H. (1989) Bio/technology 7, 1141-1149, Mitaki, A., and King, J. (1989) Bio/technology 7, 690-697)。多くの真核生物蛋白質は大腸菌内で何故不溶性のアグリゲートとして発現されるのであろうか? この点に関して、大腸菌内での真核生物蛋白質の可溶性に影響を与える2つの因子があるように思われる。

【0004】第1の因子は大腸菌のヒートショックシャペロン GroESL (groEオペロンによってコードされている)である。GroESLコンプレックスは、新たに合成されたポリペプチドが正確にフォールディングするのを触媒する役割を果たすことが最近明らかにされてきた(Weissman, J. S., Kashi, Y., Fenton, W. A., and Horwich, A. L. (1994) Cell 78, 693-702, Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P. V., Lorimer, G.H., and Buchner, J. (1994) Science 265, 656-659, Azem, A., Kessel, M., and Goloubninoff, P. (1994) Scienc

e 265, 653-656, Martin, J., Mayhew, M., Langer, T., and Hartl, F. U. (1994) *Nature* **366**, 228-233 )

。大腸菌で真核生物蛋白質を発現させるために、T7プロモーターのような強力なプロモーターがしばしば用いられる。この場合、大腸菌シャペロンGroESLの高レベル発現が必要である。例えば、λファージが大腸菌に感染するときは、GroESLの発現が誘導される。GroESLの発現レベルが上昇しないときは、λファージはλコート蛋白質のフォールディングが正確に起こらないためファージ粒子を形成することができない (Georgopoulos, C., Ang, D., Liberek, K., and Zylicz, M. (1990) in *Stress Proteins in Biology and Medicine* (Morimoto, R. I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C., eds) pp. 191-221, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)。従って、外来蛋白質の適切なフォールディングのためには、大腸菌シャペロンの同等の誘導と高レベルの発現が要求されるようである。

【0005】大腸菌内での真核生物蛋白質の可溶性に影響を与える第2の因子は、大腸菌と真核細胞の間の酸化還元状態の相違であろう。本発明者らは、大腸菌内で発現した種々の哺乳類蛋白質のGST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) との融合蛋白質は、グルタチオンセファロースビーズに極めて効率的に結合するものが多いが、哺乳類細胞中で発現したGST-融合蛋白質はグルタチオンビーズに効率的に結合しないことを観察した。この事実は、哺乳類細胞が大腸菌とは異なる酸化還元的环境を有することを示唆する。この観察と一致して、哺乳類細胞には、極めて高濃度のグルタチオンが保持されているという報告がある (Kondo, T., Yoshida, K., Urata, Y., Goto, S., Gasa, S., and Taniguchi, N., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 20366-20372)。

【0006】大腸菌において目的とする外来遺伝子が封入体として発現されるのを回避するための手法としては、従来は、第1に、上記のようなシャペロンあるいはフォールダーゼ (foldase) を外来遺伝子と共発現させる方法が知られている。かかるシャペロンは熱ショックプロテインであり、大腸菌の場合は上記のGroESL (GroESおよびGroEL) がその代表的なものである。一方、フォールダーゼとしては、蛋白質のジスルフィド結合形成に関与するペリプラズム酵素であるDsbA、その酸化還元酵素であるDsbBやX-Proペプチド結合の異性化を触媒するペプチジル プロリル cis-trans イソメラーゼ (PPIアーゼ) 等が知られている。

【0007】これらのシャペロンあるいはフォールダーゼの過剰な共発現は、特定の場合には有用であるようである。しかし、あらゆる蛋白質の封入体形成の問題への普遍的解決とはなり難い。蛋白質が異なればフォールディングの経路も異なり、細胞内での蛋白質の正確なフォ

ールディングには、それぞれのシャペロンが独立に必須となるからである (Hockney, R. C. (1994) *Trends Biotechnol.* **12**, 456-463)。

【0008】第2の手法としては、目的の外来遺伝子を他の蛋白質との融合蛋白質として発現させる方法である。他の蛋白質としては、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) (Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) *Gene* **67**, 31-40)、マルトース結合蛋白質 (MPB) (Bedouelle, H. and Duplay, P. (1988) *Eur. J. Biochem.* **171**, 541-549)、プロテインA (Nilsson, B., Holmgren, E., Josephson, S., Gatenbeck, S., Philipson, L., and Uhlen, M. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 1151-1162)、プロテインAのイムノグロブリン結合Z-ドメイン (Nilsson, B., et al. (1987) *Prot. Eng.* **1**, 107-113)、またはプロテインG (Nygren, P.-A., Eliasson, M., Abrahamson, L. and Uhlen, M. (1988) *J. Mol. Recog.* **1**, 69-74) 等が用いられ、通常、目的蛋白質をこれらの蛋白質のC-末端側に融合した蛋白質として発現させる。元来、アフィニティーによる精製や定量を容易にするためこれら融合蛋白質として発現させることが意図されたが、封入体を形成する蛋白質でもこれらを融合蛋白質として発現させた場合、しばしば可溶性となることも大きな利点として挙げられる。融合蛋白質とすることにより可溶化することは、特にGSTとの融合蛋白質においてみられる現象であるが、その後の特筆すべき成果として、McCoyらによるチオレドキシンとの融合蛋白質として発現させる方法を挙げることができる。すなわち、彼らによるとチオレドキシンと融合させ、低温で発現させることにより、11種類のリンホカインを可溶性でかつ高レベルに大腸菌内に蓄積させることが可能になった (LaVallie, E. R. et al. (1993) *Bio/Technology* **11**, 187-193)。

【0009】しかしながら、融合蛋白質のままでは、多くの蛋白質はその機能を発揮できないので、目的の蛋白質を得るためには、アフィニティー精製した融合蛋白質をペプチダーゼにより切断し、目的の蛋白質だけを分離精製しなければならない。この切断と精製の効率が極めて低い場合も少なくはなく、融合蛋白質として発現させる方法のひとつの欠点となっている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】上記の状況の下で、封入体の生成を回避し目的の蛋白質を生物学的に活性な可溶型として発現させる一般的な方法の開発が産業界および研究の分野で切望されている。従って、本発明の第1の目的は、チオレドキシン遺伝子の発現ベクターと外来の目的遺伝子の発現ベクターとにより共形質転換された細菌を提供することにある。また、本発明の第2の目的は、かかる共形質転換細菌を用いて、大腸菌の菌体内で封入体のような不溶性のアグリゲートとして産生される主として真核生物の遺伝子産物を、他の蛋白質との融合

体としてではなく、それ本来の形で可溶型として生産する方法を提供することにある。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、大腸菌において不溶性アグリゲートとして菌体内に蓄積する真核生物細胞蛋白質の可溶化について鋭意検討を行ったところ、大腸菌における種々の真核生物細胞蛋白質の可溶化がチオレドキシンを同時に産生させることにより劇的に増大することを発見した。即ち、チオレドキシン遺伝子を共発現させることにより、検討を加えた転写因子やオンコジーン産物をふくむ8種の蛋白質の全てを可溶型として発現させることに成功した。一方、同時に行った大腸菌シャベロンであるGroESLとの共発現では、検討した8種の蛋白質のうち4種の可溶化を改善したにとどまった。本発明はかかる発見に基づき、さらに研究を重ねて完成するに至ったものである。

【0012】即ち、本発明の要旨は、(1) チオレドキシン遺伝子の発現ベクターと目的遺伝子の発現ベクターにより形質転換されてなる共形質転換細菌、(2) チオレドキシンが、大腸菌のチオレドキシン、ヒトのチオレドキシン、グルタレドキシン、またはプロテインジスルフィドイソメラーゼのチオレドキシン様ドメインである請求項1記載の共形質転換細菌、(3) チオレドキシン遺伝子の発現ベクターが、T7プロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、trpプロモーター、λPLプロモーター、araプロモーターのいずれかの制御下にチオレドキシン遺伝子の発現を可能とするものである前記(1)または(2)記載の共形質転換細菌、(4) 目的遺伝子が、インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン受容体、インターロイキン受容体拮抗物質、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、トロンボポエチン、白血病抑制因子、幹細胞成長因子、腫瘍壊死因子、成長ホルモン、プロインスリン、インスリン様成長因子、繊維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、トランスフォーミング成長因子、肝細胞成長因子、骨形成因子、神経成長因子、毛様体神経栄養因子、脳由来神経栄養因子、グリア細胞由来神経栄養因子、ニューロトロフィン、ウロキナーゼ、組織プラズミンノーゲンアクチベーター、血液凝固因子、プロテインC、グルコセレブロシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、レニン、リゾチーム、P450、プロキモシン、トリプシンインヒビター、エラスターゼインヒビター、リボコルチン、免疫グロブリン、1本鎖抗体、補体成分、血清アルブミン、ウイルス構成蛋白質、プロトオンコジーン産物、および転写調節因子からなる群より選択されるものである前記(1)～(3)いずれかに記載の共形質転換細菌、並びに(5) 前記(1)～(4)いずれかに記載の共形質転換細菌を用いて、目的遺伝子

がコードするタンパク質を可溶性蛋白質として発現させることを特徴とする可溶性蛋白質の生産方法、に関する。

#### 【0013】

【発明の実施の形態】以下に本発明の詳細について説明する。

##### (1) プラスミドの構築

本発明の共形質転換細菌は、チオレドキシン遺伝子の発現ベクターと目的遺伝子の発現ベクターの両者により形質転換されており、細菌細胞内でチオレドキシンと目的遺伝子産物の両者を同時に発現することができる形質転換体を意味する。かかる形質転換細菌を作製するためには、チオレドキシン遺伝子の発現ベクターと目的遺伝子の発現ベクターとが必要である。通常、同一宿主に近縁の2種のプラスミドは安定に共存できない(この現象を不和合性という。)ので、両プラスミドが互いに不和合性を示さないレプリコンを有するものであれば使用可能であり、特に限定されるものではない。発現効率という観点からは、プロモーターの選択も重要な要因となるが、これも通常強力なプロモーターとして知られているものから選択が可能である。例えば、T7RNAポリメラーゼによって特異的にかつ強力に転写されるT7プロモーターや、イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)で転写誘導が可能なlacプロモーターもしくはtacプロモーターあるいはtrcプロモーター、3-インドールアクリル酸(IAA)で転写誘導が可能なtrpプロモーターのほか、高温(42℃)で誘導可能なλPLプロモーター、さらにはアラビノースで誘導可能なaraプロモーター等が使用できる。

【0014】本発明に用いられるチオレドキシンは大腸菌のチオレドキシン(Lunn, C. A., Kathju, S., Wallace, B. J., Kushner, S. R., and Pigiet, V. (1984) J. Biol. Chem. 259, 10469-10474)のみでなく、ヒトのチオレドキシン(Wollman, E. E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A., Jacquot, J. P., Wingfield, P., Graber, P., Dessarps, F., Robin, P., Galibert, F., et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 15506-15512)、グルタレドキシン(Hoog, J. O., von Bahr-Lindstrom, H., Jornvall, H., and Holmgren, A. (1986) Gene 43, 13-21, Fernando, M. R., Sumimoto, H., Nanri, H., Kawabata, S., Iwanaga, S., Minakami, S., Fukumaki, Y., and Takashige, K. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1218, 229-231)、プロテインジスルフィドイソメラーゼのチオレドキシン様ドメイン(Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A., and Rutter, W. J. (1985) Nature 317, 267-270, Tachikawa, H., Miura, T., Katakura, Y., and Mizunaga, T. (1991) J. Biochem. 110, 306-313)等も使用可能である。本発明の特徴は、チオレドキシンの共発現により宿主細胞内の酸化還元電位をより還元型とし、真核生物細胞のそれに近づ

けることにあり、その意味では上記のチオレドキシンはいずれも大腸菌チオレドキシンと同様の効果を発揮できるからである。以下には、大腸菌チオレドキシン (Trx) を例にとり、プロモーターとしてT7プロモーターを利用した場合の発現ベクターの構築について説明する。

【0015】目的遺伝子の発現ベクターとして、T7プロモーターとpBR322由来のレプリコンを含むpETベクターを使用する場合、Trxを目的の外来蛋白質の発現レベルと同レベルで発現させるために、Trxコード領域をT7プロモーターに連結し、p15Aレプリコンおよびクロラムフェニコール耐性 (Cm) マーカー遺伝子を含むpACYCベクター (Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. (1978) J. Bacteriol. 134, 1141-1156) に挿入する。得られたプラスミド、pT-Trxは、プラスミド和合性の範囲内で、種々の脊椎動物蛋白質を発現するpETプラスミドと共形質転換を行うことが可能である。

【0016】まず、T7プロモーターと例えばp15Aレプリコンを含むプラスミド (pACYC-T7) を作製するには、p15Aレプリコンを有するプラスミドpACYC184 (Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. (1978) J. Bacteriol. 134, 1141-1156) の0.5 kb HindIII-SphI断片を、プラスミドpAR2156 (Studier F. W., and Moffatt, B. A. (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130, Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J. J., and Studier F. W. (1987) Gene 56, 125-135) 由来のT7プロモーターを含む0.6 kb HindIII-SphI断片で置換する方法が用いられる。

【0017】ついで、Trxをコードする領域にT7プロモーターを連結させたプラスミド (pT-Trx) を作製するには、例えばpT-GroEのNdeI-HindIII断片を、米国 Invitrogen 社より販売されているプラスミドpTrx由来の大腸菌チオレドキシンのコード領域とaspA転写ターミネーターを含むNdeI-HindIII断片で置換する方法を用いることができる。このpT-GroE (T7プロモーターの制御下に大腸菌GroESLを発現するプラスミド) は、groEプラスミド (pKV1561) (Kanemori, M., Mori, H., and Yura, T. (1994) J. Bacteriol. 176, 4235-4242) を鋳型としてポリメラーゼ チェイン リアクション (PCR) により調製した、GroESL-コード領域を含む2.1 kbのNdeI-BglII DNA断片を、pACYC-T7のNdeI-BamHI部位に挿入して作製することができる。

【0018】また、T7プロモーター以外のプロモーターを用いる例として、3-インドールアクリル酸で誘導可能なtrpプロモーターを利用したTrx発現プラスミドは、例えば以下のようにして構築することができ

る。pTrx (米国 Invitrogen 社製) から調製したTrxのコード領域とaspA転写ターミネーターを含むNdeI-HindIII断片を、例えばpM594 (Morishita, H., Yamakawa, T., Matsusue, T., Kusuyama, T. et al., (1994) Thromb. Res. 73, 193-204) をEcoRI-HindIII消化して得られるtrpプロモーター/オペレーターを含む断片と連結し、シャトルベクターpHY300PLK (宝酒造社製) のBglII-AccI断片と結合させて、pACYC177由来のレプリコンとアンピシリン耐性遺伝子を持つtrpプロモーターによるTrx発現プラスミドが作製できる。さらに、必要に応じて、アンピシリン耐性遺伝子上のScaI部位に、pUC4K (スウェーデン Pharmacia Biotech社製) から得られるカナマイシン耐性遺伝子を含むSalI断片を挿入して、薬剤耐性マーカーを変換することもできる。

【0019】本発明に用いられる目的遺伝子としては、インターフェロン、インターロイキン、インターロイキン受容体、インターロイキン受容体拮抗物質、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、トロポポエチン、白血病抑制因子、幹細胞成長因子、腫瘍壊死因子、成長ホルモン、プロインスリン、インスリン様成長因子、繊維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、トランスフォーミング成長因子、肝細胞成長因子、骨形成因子、神経成長因子、毛様体神経栄養因子、脳由来神経栄養因子、グリア細胞由来神経栄養因子、ニューロトロフィン、ウロキナーゼ、組織プラズミンノーゲンアクチベーター、血液凝固因子、プロテインC、グルコセレブロシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、レニン、リゾチーム、P450、プロキモシン、トリプシンインヒビター、エラスターゼインヒビター、リポコルチン、免疫グロブリン、1本鎖抗体、補体成分、血清アルブミン、ウイルス構成蛋白質、プロトオンコジーン産物、および転写調節因子等が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、通常の遺伝子発現方法により大腸菌等で発現させた場合に封入体のような不溶性の蛋白質として発現される真核生物の遺伝子はすべて使用できる。以下には、マウスc-Myb遺伝子、cAMP応答エレメント結合蛋白質 (CRE-BP1) 遺伝子、p53癌抑制遺伝子、Xenopus Mosプロトオンコジーン、lck遺伝子、skier関連遺伝子、mycプロトオンコジーン、アデノウイルスオンコジーンの8種を目的遺伝子として使用した例で説明する。

【0020】各種の脊椎動物の目的蛋白質を発現するプラスミドは、前記のように、例えばT7プロモーターおよびpBR322由来のレプリコンを含む適当なpET発現ベクター (Studier F. W., and Moffatt, B. A. (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130, Rosenberg, A.

H., Lade, B. N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J. J., and Studier F. W. (1987) *Gene* **56**, 125-135)と目的蛋白質をコードするcDNAを用いて構築することができる。

#### 【0021】(2) 共形質転換細菌の作製

本発明に用いられる共形質転換細菌は、前記のように、目的の外来遺伝子発現ベクターとチオレドキシン遺伝子発現ベクターの両方で形質転換され、目的の遺伝子産物とチオレドキシンとを同時に発現することができる細菌である。本発明に用いられる宿主細胞は、真核生物遺伝子を発現した場合に、発現産物を封入体のような不溶性蛋白質として菌体内に蓄積する微生物細胞である。特に、大腸菌のようなグラム陰性細菌が適当である。T7プロモーターを利用した発現ベクターを用いる場合は、例えばT7RNAポリメラーゼ遺伝子を組み込んだλファージを溶原化した大腸菌等、T7RNAポリメラーゼを発現する細菌が用いられる。以下に大腸菌を宿主細胞とした場合を例にとり説明する。

【0022】次に、前記のようにして構築したpT-TxベクターおよびpETベクターを用いて、例えば大腸菌BL21(DE3)株(Studier F. W., and Moffatt, B. A. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130、Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J. J., and Studier F. W. (1987) *Gene* **56**, 125-135)を形質転換し、両方のベクターを保持する形質転換細菌を作製する。大腸菌BL21(DE3)株は、lacUV5プロモーター下流に結合させたT7RNAポリメラーゼ遺伝子をもつλファージを染色体上に溶原化しており、IPTGで誘導することにより、大量のT7RNAポリメラーゼを菌体内に発現させることができ、T7プロモーター支配下の遺伝子の大量発現に極めて好適な宿主菌株である。

【0023】また、外来蛋白質とTxの両方を発現する細菌(共形質転換細菌)を作製するには、前記のようにして得られるpT-Txを保持する大腸菌BL21(DE3)株を、種々の哺乳類蛋白質をコードするpETベクターで形質転換することにより得られる。すなわち、まず大腸菌BL21(DE3)株を対数増殖期中期まで振盪培養し、遠心分離で菌体を集め、カルシウムイオンの存在下で低温処理しDNA取り込み能をもったコンピテント細胞を調製する。コンピテント細胞は滅菌グリセロールを終濃度約15%となるように添加することにより、-70℃で凍結保存できる。上記コンピテント細胞の懸濁液にpT-Tx溶液を加え、42℃の熱処理を行ったのち、液体培地を加え薬剤耐性遺伝子が発現するまで回復培養し、適当な薬剤を含む寒天培地上に広げて培養する。生じたコロニーを単離し、pT-Txで形質転換された大腸菌BL21(DE3)株を得る。次いで、pT-Txで形質転換された大腸菌BL21(DE3)株のコンピテント細胞を同様に調製し、この

コンピテント細胞の懸濁液に種々の蛋白質をコードする発現プラスミドpETの溶液を加え、同様に形質転換を行い、pT-Txおよび種々の哺乳類蛋白質をコードするpETの両方のプラスミドを保持する大腸菌BL21(DE3)株を得ることができる。

【0024】コンピテント細胞の調製法には種々の変法があるが、いずれの方法も利用できる。また、大腸菌の形質転換法としては、大腸菌とDNAの浮遊液に高電圧パルスをかけることにより細胞にDNAを取り込ませるエレクトロポレーション法も知られており、この方法も利用可能である。pT-Txおよび種々の哺乳類蛋白質をコードするpETの両方のプラスミドを同時に大腸菌BL21(DE3)株に導入することも可能であるが、一旦pT-Txで形質転換した大腸菌株を作製しておき、この形質転換株にさらに目的に応じて種々の哺乳類蛋白質をコードするpETプラスミドを導入するという2段階で形質転換する方法をとるのが便利である。このようにして得られた共形質転換細菌として、E. coli BL21(DE3)/Tx-Mybが工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている(FERM P-15232)。

#### 【0025】(3) 共形質転換細菌による真核生物遺伝子の発現

得られた共形質転換細菌を適当な培地例えばスーパーブロス(トリプトン32g、酵母エキス20g、NaCl 5g、1N-NaOH 5ml/リットル)中でA550が約0.7になるまで培養し、次いでIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)で誘導をかけ蛋白質を発現させる。細菌を遠心分離により集菌し、PBS(130mMのNaCl、2.7mMのKCl、10mMのリン酸カリウムバッファー、pH7.2)で洗浄し、バッファーA(50mMのトリス塩酸、pH7.5、5mMのMgCl<sub>2</sub>、0.5mMのEDTA、0.1MのNaCl)に懸濁し、超音波により破碎する。遠心分離後、上清を採取し目的の可溶性蛋白質を得ることができる。

【0026】① 目的蛋白質として、マウスc-Myb(Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T. J., and Ishii, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5758-5762)、cAMP応答エレメント結合蛋白(CRE-BP1)(Maekawa, T., Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Sudo, T., Fujisawa, J., Yoshida, M., and Ishii, S. (1989) *EMBO J.* **8**, 2023-2028)、p53癌抑制遺伝子産物(Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1992) *Cell* **70**, 523-526)、Xenopus Mosプロトオンコジーン産物(Mos)(Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., and Ikawa, Y. (1989) *Nature* **342**, 512-518)、ヒトlck遺伝子産物(Lck)(Marth, J. D., Peet, R., Krebs, E. G., and Perlmutter, R. M. (1985) *Cell* **4**

3, 393-404)、s k i-関連遺伝子産物(S n o N)(Nagase, T., Nomura, N., and Ishii, S. (1993) J. Biol. Chem. 268, 13710-13716)、m y cプロトオンコジーン産物(M y c)(Luescher, B., and Eisenman, R. N. (1990) Genes Dev. 4, 2025-2035)、およびアデノウイルスオンコジーン産物(E 1 A)(Moran, E., and Mathews, M. B. (1987) Cell 48, 177-178)の8種の遺伝子産物を選択し、その溶解性に対するT r xの共発現の影響を調べる。

【0027】② その結果、実施例に示すように、T r xの共発現により、検討した8種の外来蛋白質すべての溶解性を顕著に増加させることが分かる。一方、従来可溶性因子として知られているG r o E S Lの共発現の場合は、検討した8種のうち4種の外来蛋白質の溶解性を顕著に増加させたもののその程度はT r xの共発現の場合よりも小さく、また残りの4種については溶解性の増加が認められない。これらの事実から、T r x共発現系がG r o E共発現系よりもはるかに有用性が高いと結論することができる。

【0028】(4) 共発現により得られる可溶型蛋白質のコンフォーメーション

封入体のような不溶性蛋白質として発現したものを尿素処理等で可溶化した場合は、得られた蛋白質はその蛋白質本来のコンフォーメーションを持たないものが多いことが知られている。そこで、L c kの自己リン酸化活性をメルクマールとして本発明の方法により可溶型として発現された蛋白質が本来のコンフォーメーションを有するか否かについてしらべると、実施例に示すように、尿素によって可溶化された蛋白質試料についてはその一部分しか本来のコンフォーメーションを持っていないのに対し、T r xの共発現により可溶型として発現された蛋白質は天然蛋白質のコンフォーメーションをもつと結論できる。

【0029】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0030】実施例1

プラスミドの構築

T7プロモーターを含むプラスミド(p A C Y C-T7)を作製するために、p A C Y C 184 (Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. (1978) J. Bacteriol. 134, 1141-1156)の0.5 kb Hind III-Sph I DNA断片をp A R 2 1 5 6ベクター(Studier F. W., and Moffatt, B. A. (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130、Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J. J., and Studier F. W. (1987) Gene 56, 125-135)由来のT7プロモーターを含む0.6 kb Hind III-Sph I断片で置換した。

【0031】G r o E S L-コード領域(2.1 kb)

の5'末端にNde I部位を、3'末端にBgl II部位をもつDNA断片を、g r o Eプラスミド(p K V 1 5 6 1)(Kanemori, M., Mori, H., and Yura, T. (1994) J. Bacteriol. 176, 4235-4242)を鋳型としたPCRにより作製し、p A C Y C-T7のNde I-Bam HI部位に挿入してT7プロモーターの制御下に大腸菌G r o E S Lを発現するプラスミド(p T-G r o E)を作製した(図1)。

【0032】T r xをコードする領域にT7プロモーターを連結させたプラスミド(p T-T r x)を作製するために、p T-G r o EのNde I-Hind III断片を、米国 Invitrogen 社より販売されているプラスミドp T r x由来の大腸菌チオレドキシンのコード領域とa s p A転写ターミネーターを含むNde I-Hind III断片で置換した(図2)。

【0033】目的の脊椎動物の蛋白質を発現するプラスミドは、T7プロモーターおよびp B R 3 2 2由来のレプリコンを含む適当なp E T発現ベクター(Studier F. W., and Moffatt, B. A. (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130、Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J. J., and Studier F. W. (1987) Gene 56, 125-135)と目的の蛋白質をコードするcDNAを用いて構築した。すなわち、マウスc-M y b cDNA (Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T. J., and Ishii, S. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 5758-5762)、cAMP応答エレメント結合蛋白(CRE-BP) cDNA (Maekawa, T., Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Sudo, T., Fujisawa, J., Yoshida, M., and Ishii, S. (1989) EMBO J. 8, 2323-2328)、p 5 3癌抑制遺伝子産物cDNA (Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1992) Cell 70, 523-526)、Xenopus Mos cDNA (Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., and Ikawa, Y. (1989) Nature 342, 512-518)、ヒトS n o N cDNA (Nagase, T., Nomura, N., and Ishii, S. (1993) J. Biol. Chem. 268, 13710-13716)、ヒトc-M y c cDNA (Luscher, B. and Eisenman, R. N. (1990) Genes Dev. 4, 2025-2035)、アデノウイルスE 1 A遺伝子(Moran, E. and Mathews, M. B. (1987) Cell 48, 177-178)を用いて、PCR法によりNde IとHind III部位をそれぞれ5'末端と3'末端に持つ各DNA断片をそれぞれ調製し、p A R 2 1 5 6ベクター(Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130、Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J. J., and Studier, F. W. (1987) Gene 56, 125-135)のT7プロモーター下流のNde I-Hind III断片と置換した。

【0034】実施例2

共形質転換体の作製

(1) 実施例1に示したように、外来の目的蛋白質を

発現するために、T7プロモーターとpBR322由来のレプリコンを含むpETベクターを使用した。TrxまたはGroESLを目的の外来蛋白質の発現レベルと同レベルで発現させるために、Trxコード領域またはGroESLコード領域をT7プロモーターに連結し、p15Aレプリコンおよびクロラムフェニコール耐性(Cm)マーカー遺伝子を含むpACYCベクター

(Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. (1978) J. Bacteriol. 134, 1141-1156) に挿入した(図1および図2)。得られたプラスミド、pT-TrxまたはpT-GroEは、プラスミド和合性の範囲内で、種々の脊椎動物蛋白質を発現するpETプラスミドと共形質転換を行うことが可能であった。

【0035】(2) これらのプラスミドからTrxまたはGroESLが発現したことを確認するため、大腸菌BL21(DE3)株をpT-TrxまたはpT-GroEプラスミドで形質転換し、IPTGの存在下または非存在下に培養した。図3は各培養物の全蛋白質をSDS-PAGE後にクマジー染色したものを示す。pT-TrxからTrxが、またpT-GroEからGroESとGroELが過剰発現しており、TrxまたはGroESとGroELは全細胞蛋白質の30%を超えていることが分かった。

【0036】(3) 外来蛋白質とTrxまたは外来蛋白質とGroEの両方を発現する細菌を作製するため、pT-TrxまたはpT-GroEを保持する大腸菌BL21(DE3)株を種々の哺乳類蛋白質をコードするpETベクターで形質転換した。すなわち、大腸菌BL21(DE3)株をLB(トリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム10g/リットル、pH7.0)寒天培地上で37℃にて16~20時間培養し、生育したシングルコロニーを1リットル容フラスコ中のLB液体培地100mlに移してOD<sub>600</sub>が0.4~0.5に達するまで約3時間37℃で振盪培養した。培養液を氷上で10分間冷却し、4000rpm、10分間の遠心分離により菌体を集めた。菌体を氷冷した20mlの0.1M CaCl<sub>2</sub>に懸濁し、氷水中に20分間放置した。4000rpm、10分間遠心分離し菌体を集め、再度氷冷した4mlの0.1M CaCl<sub>2</sub>に懸濁し大腸菌BL21(DE3)コンピテント細胞を調製した。このコンピテント細胞の懸濁液200μlを滅菌した試験管にとり、これに上記のとおり作製したpT-Trx溶液10μl(DNA量は10ng以下)を加え静かに混和して氷上に30分間おいたのち、42℃の恒温槽に90秒間浸し、直ちに氷冷した。800μlのSOC(グルコース20mM、トリプトン20g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム0.5g、250mM KClの10ml/リットル、pH7.0、使用直前に2MのMgCl<sub>2</sub>5mlを添加)培地を加え、37℃の恒温槽に45分間静置したのち、クロラムフェニコール(1

0μg/ml)を含むSOB(トリプトン20g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム0.5g、250mM KClの10ml/リットル、pH7.0、使用直前に2MのMgCl<sub>2</sub>5mlを添加)寒天培地上に広げ、37℃で16時間培養し、pT-Trxで形質転換された大腸菌BL21(DE3)株を得た。pT-Trxの代わりにpT-GroEを用いて、同様にpT-GroEで形質転換された大腸菌BL21(DE3)株を得た。

【0037】次に、pT-Trxで形質転換された大腸菌BL21(DE3)株をクロラムフェニコールを含むLB寒天培地上で37℃にて16~20時間培養し、生育したシングルコロニーを1リットル容フラスコ中のLB液体培地100mlに移してOD<sub>600</sub>が0.4~0.5に達するまで約3時間37℃で振盪培養した。培養液を氷上で10分間冷却し、4000rpm、10分間の遠心分離により菌体を集めた。菌体を氷冷した20mlの0.1M CaCl<sub>2</sub>に懸濁し、氷水中に20分間放置した。4000rpm、10分間遠心分離し菌体を集め、再度氷冷した4mlの0.1M CaCl<sub>2</sub>に懸濁しpT-Trxを保持する大腸菌BL21(DE3)コンピテント細胞を調製した。このコンピテント細胞の懸濁液200μlを滅菌した試験管にとり、これに上記のとおり作製した種々の脊椎動物蛋白質をコードするpETベクターの溶液10μl(DNA量は10ng以下)を加え静かに混和して氷上に30分間おいたのち、42℃の恒温槽に90秒間浸し、直ちに氷冷した。800μlのSOC培地を加え、37℃の恒温槽に45分間静置したのち、クロラムフェニコール(10μg/ml)、アンピシリン(50μg/ml)を含むSOB寒天培地上に広げ、37℃で16時間培養し、種々の脊椎動物蛋白質をコードするpET発現ベクターで形質転換されたpT-Trx保持大腸菌BL21(DE3)株を得た。同様にpT-GroEで形質転換された大腸菌BL21(DE3)株を用いて、種々の脊椎動物蛋白質をコードするpET発現ベクターで形質転換されたpT-GroE保持大腸菌BL21(DE3)株を得た。

【0038】(4) 得られた細菌を、クロラムフェニコール(10μg/ml)とアンピシリン(50μg/ml)を含むスーパーブロス2.5ml中でA<sub>550</sub>が0.7になるまで培養し、ついで1mMのIPTGで4時間誘導をかけ蛋白質を発現させた。細菌を遠心分離により集菌し、PBS(130mMのNaCl、2.7mMのKCl、10mMのリン酸カリウムバッファー、pH7.2)で洗浄し、150μlのバッファーA(50mMのトリス塩酸、pH7.5、5mMのMgCl<sub>2</sub>、0.5mMのEDTA、0.1MのNaCl)に懸濁し、超音波により破碎した。遠心分離後、上清を採取し可溶性画分とする。ペレットを200μlのSDSサンプルバッファー中に懸濁し、3分間煮沸し、遠心分離した。この上清を採取し不溶性画分とした。



## 【0039】実施例3

大腸菌により発現された脊椎動物蛋白質の溶解性に対する大腸菌チオレドキシンまたは大腸菌シャペロンGroESLの共発現の影響

(1) まず、脊椎動物蛋白質の溶解性に対するTrxの共発現の影響を検討した(図4において、+Trxとマークしたレーンを参照)。各種の外来蛋白質を発現させるために、pETプラスミドのみを保持するBL21(DE3)形質転換細菌およびpETプラスミドとpT-Trxプラスミドの両者を保持する形質転換細菌を使用した。各蛋白質の発現と溶解性を評価するために、これらの形質転換細菌をスーパーブロス中、37℃でA<sub>550</sub>が0.7になるまで培養し、IPTGで誘導の4時間後に集菌し、超音波処理(超音波破碎装置(トミー精工社製モデルUD-20P)、10秒間×5回)を行い、遠心分離(15,000rpm、10分間)により、可溶性画分と不溶性画分とに分画した。両画分の蛋白質をSDS-PAGEで分離し、クマジー染色を行った。

【0040】pETプラスミドのみで形質転換された(pT-Trxプラスミドを保持しない)大腸菌の場合は、マウスc-Mybは完全な不溶性アグリゲートとして発現された。しかし、Trxの共発現によって、マウスc-Myb(Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T. J., and Ishii, S. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 5758-5762)の溶解性は劇的に増加し、培養物1リットル当たり約30mgの可溶性c-Mybが産生された。

【0041】同様な溶解性の増加が、Trxの共発現によって二つの他のヒト転写因子である、cAMP応答エレメント結合蛋白(CRE-BP1)(Maekawa, T., Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Sudo, T., Fujisawa, J., Yoshida, M., and Ishii, S. (1989) EMBO J. 8, 2023-2028)およびp53癌抑制遺伝子産物(Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1992) Cell 70, 523-526)についても観察され、培養物1リットル当たりCRE-BP1については約60mg、p53癌抑制遺伝子産物については約100mgの可溶性蛋白質が産生された。

【0042】脊椎動物のキナーゼの溶解性に対するTrx共発現の影響についても検討した。Ser/Thrキナーゼの1種であるXenopus Mosプロトオンコジーン産物(Mos)(Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., and Ikawa, Y. (1989) Nature 342, 512-518)、およびsrcジーンファミリーの1員でありチロシンキナーゼの1種であるHtlck遺伝子産物(Lck)(Marth, J. D., Peet, R., Krebs, E. G., and Perlmutter, R. M. (1985) Cell 43, 393-404)の溶解性も同様に、Trxの共発現によって改善され、培養物1リットル当たりMosについては約40mg、Lckについては約30mgの可溶性蛋白質が産

生された。

【0043】さらに、3種の他の核蛋白質である、ski-関連遺伝子産物(SnoN)(Nagase, T., Nomura, N., and Ishii, S. (1993) J. Biol. Chem. 268, 13710-13716)、mycプロトオンコジーン産物(Myc)(Luescher, B., and Eisenman, R. N. (1990) Genes Dev. 4, 2025-2035)、およびアデノウイルスオンコジーン産物(E1A)(Moran, E., and Mathews, M. B. (1987) Cell 48, 177-178)の溶解性に対するTrxの共発現の影響を調べたところ、培養物1リットル当たりMycについては約20mg、SnoNについても約20mgの可溶性蛋白質が産生された。E1AはTrxの非存在下でも約半分は可溶性として発現するが、Trxの存在下ではE1Aのほとんど全量が可溶性として発現し、培養物1リットル当たり約70mgの可溶性E1Aが発現した。

【0044】従って、Trxの共発現は、検討した8種の外来蛋白質すべての溶解性を増加させたことが分かる。

【0045】(2) 次に、上記の8種の蛋白質の溶解性に対するGroESL共発現の影響を検討した(図4において+GroEとマークしたレーンを参照)。各種の外来蛋白質を発現させるために、pETプラスミドのみを保持するBL21(DE3)形質転換体またはpETプラスミドとpT-GroEプラスミドの両者を保持する形質転換体を作製した。各蛋白質の発現と溶解性を評価するために、これらの形質転換体をスーパーブロス中、37℃でA<sub>550</sub>が0.7になるまで培養し、IPTGで誘導の4時間後に集菌し、超音波で溶菌し、得られた溶解液を遠心分離により可溶性画分と不溶性画分とに分画した。両画分の蛋白質をSDS-PAGEで分離し、クマジー染色を行った。

【0046】GroESLの共発現がない場合は、マウスc-Mybは、完全な不溶性アグリゲートとして発現された。しかし、GroESLと共発現させるとMybの溶解性は顕著に増加し、c-Mybの約10%が可溶性として発現した。この結果は、培養液1リットル当たり約20mgの可溶性c-Mybの発現レベルに相当する。同様な溶解性の増加がcAMP応答要素結合蛋白(CRE-BP1)およびp53腫瘍抑制因子産物についても観察された。また、Ser/Thrキナーゼの1種であるMosの溶解性を有意に増加した。しかし、3種の他の核蛋白質である、SnoN、Myc、およびE1Aの溶解性は、GroESLの共発現では増加しなかった。また、チロシンキナーゼの1種であるLckの溶解性は増加しなかった。以上まとめると、検討した8種のうちの4種の外来蛋白質の溶解性がGroESLの共発現によって改善されたことが分かる。上記の事実は、Trx発現系がGroE系よりもはるかに有用性が高いことを示すものである。

## 【0047】実施例4

Trxの共発現によって可溶型として発現した外来蛋白質のコンフォメーション

封入体のような不溶性蛋白質として発現したものを尿素処理等で可溶化した場合は、その蛋白質の本来のコンフォメーションを持たないものが多いことが知られている。そこで、本発明の方法により可溶型として発現された蛋白質が本来のコンフォメーションを有するかどうかについて検討した。このため、Lckの自己リン酸化活性を分析した(図5)。

【0048】Trx発現ベクターの存在下または非存在下に、Lckを発現するpETベクターを保持する大腸菌BL21(DE3)株を培養し、IPTGによる誘導後3時間Lckを発現させた。集菌後、5種のプロテアーゼ(大豆トリプシンインヒビター、アンチパイン、ペプスタチンA、キモスタチン及びロイペプチン、各10 $\mu$ g/ml)を含むバッファーL(50mMのトリス塩酸、pH8.0、0.5mMのEDTA、50mMのNaCl、1mMのDTT:0.125mMのPMSF)の1/25容量中に懸濁し、超音波で破碎した。遠心分離後、Lckの可溶型を含む上清を採取し貯蔵した(可溶性Lck)。沈殿物(不溶性Lckを含む不溶性ペレット)を8M尿素を含むバッファーLの1/50容量中に懸濁し、1時間氷冷した後遠心分離した。上清を採取し、バッファーLに対して透析し、そして貯蔵した(尿素処理不溶性サンプル)。Lckの自己リン酸化活性はLck-特異的抗体を用いて測定した(Yamanashi, Y., Kikuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T., and Toyoshima, K. (1991) Science 251, 192-194)。

【0049】以上の処理により、LckはTrx共発現系を用いることにより可溶型で発現された(図5、レーン1-4)。他方、Trxの共発現系無しに不溶型として発現されたLckは尿素処理によって可溶化された(図5、レーン5-8)。Lckのこの二つの型はLck-特異的抗体を用いる免疫沈降反応に付した。また、リン酸化活性を測定するため $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATPとインキュベートした。その結果は、図3下部に示すように、可溶

性Lckの比活性は尿素処理不溶性物質の比活性の10倍であった。この事実は、尿素によって可溶化された蛋白質サンプルの一部分しか本来のコンフォメーションを持っていないことを示す。これに反し、Trxの共発現により可溶型として発現された蛋白質は天然蛋白質のコンフォメーションを持つといえる。

## 【0050】

【発明の効果】本発明により、従来不溶性蛋白質としてしか細菌中では発現されなかった真核生物の蛋白質を可溶性蛋白質として発現させることが可能となった。また、一部可溶性蛋白質として発現されていた真核生物蛋白質の可溶性蛋白質の割合を増加させることが可能となった。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、大腸菌シャペロンGroESLの発現ベクターを示す図である。

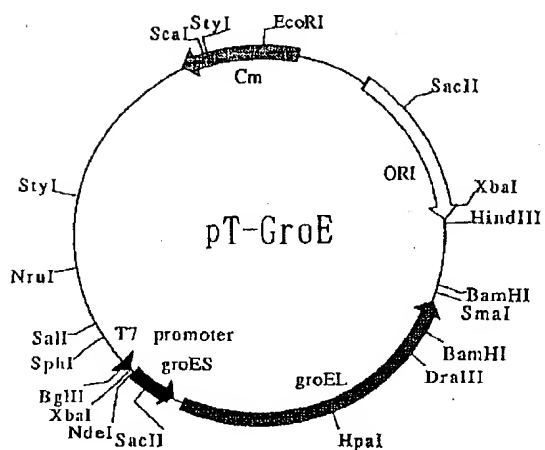
【図2】図2は、大腸菌チオレドキシンの発現ベクターを示す図である。

【図3】図3は、GroESLの発現ベクターまたは大腸菌Trxの発現ベクターを用いてIPTGによる誘導発現で得られた蛋白質をSDS-PAGEにかけクマジー染色して得られた発現蛋白質の電気泳動を示す写真である。

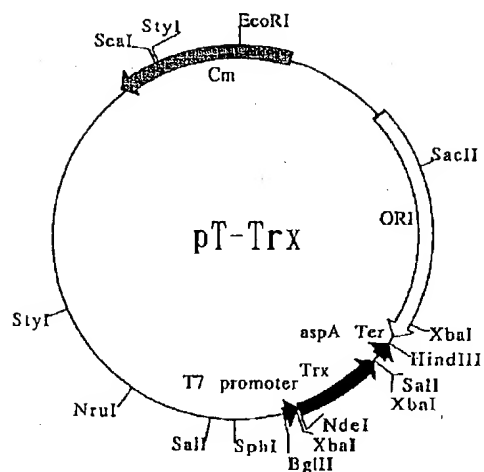
【図4】図4は、SDS-PAGE-クマジー染色により得られたGroESLまたはTrxの共発現により増加した可溶性哺乳類蛋白質の電気泳動を示す写真である。+は共発現系を、-は単独発現系を示す。Sは可溶性蛋白質を、Iは不溶性蛋白質を示す。

【図5】図5は大腸菌中で発現した可溶性Lckと尿素処理LckのLck特異抗体による免疫沈降およびLckの自己リン酸化活性を表す電気泳動の写真である。上部はLck特異的免疫沈降反応物を電気泳動し、ウェスタンブロットティング後にLck特異抗体で可視化して得られた写真である。下部は $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATPとインキュベートしたときの自己リン酸化活性を電気泳動のオートラジオグラフィーで可視化して得られた写真である。

【図1】

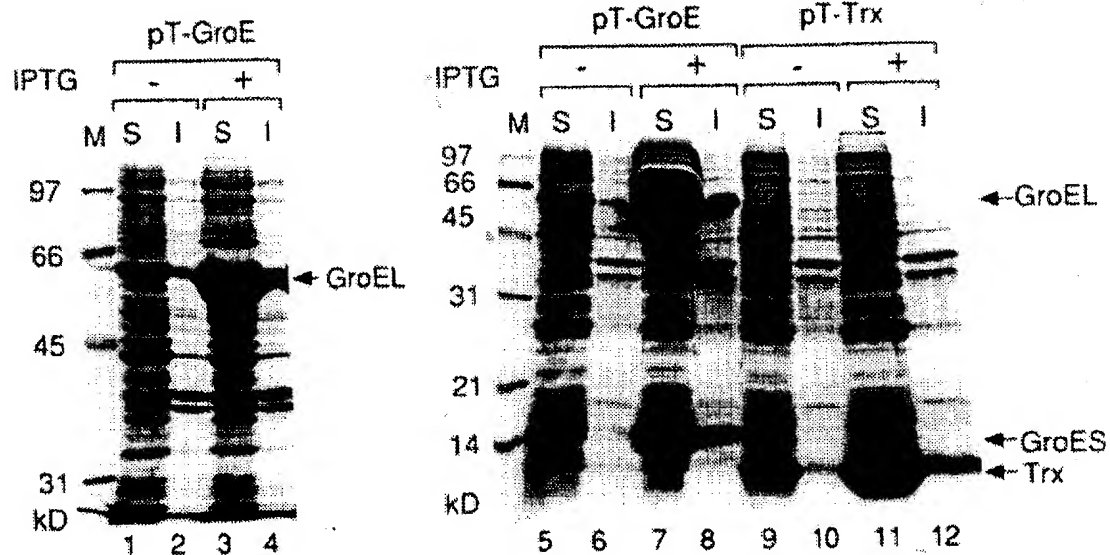


【図2】



【図3】

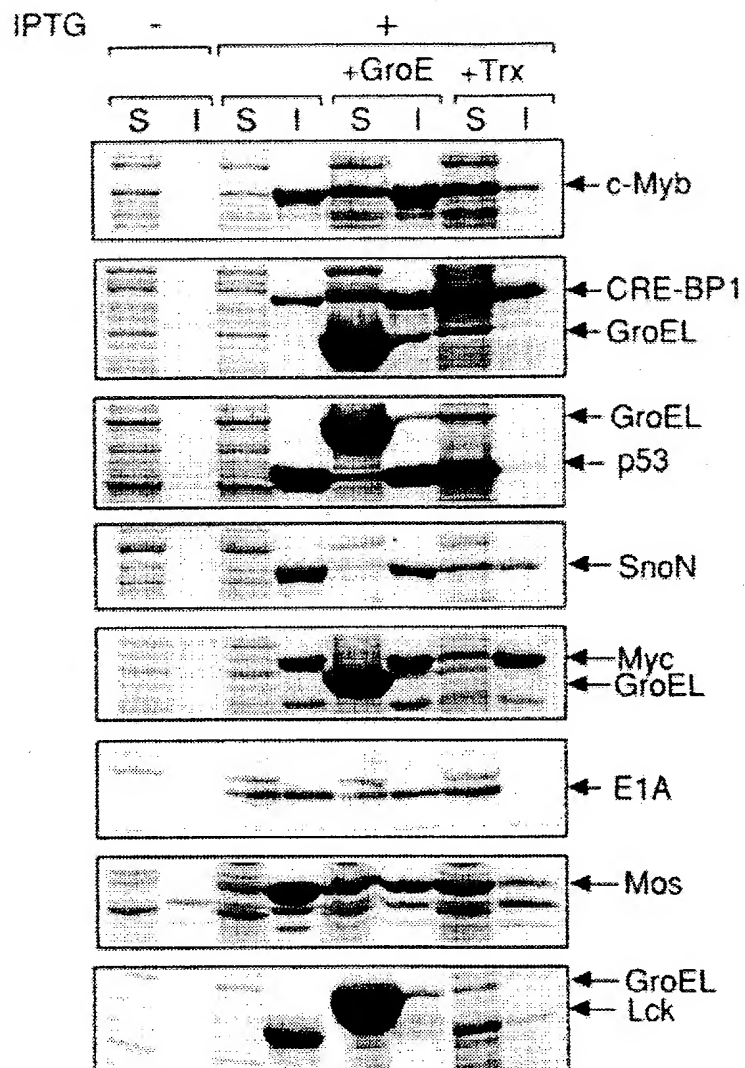
B



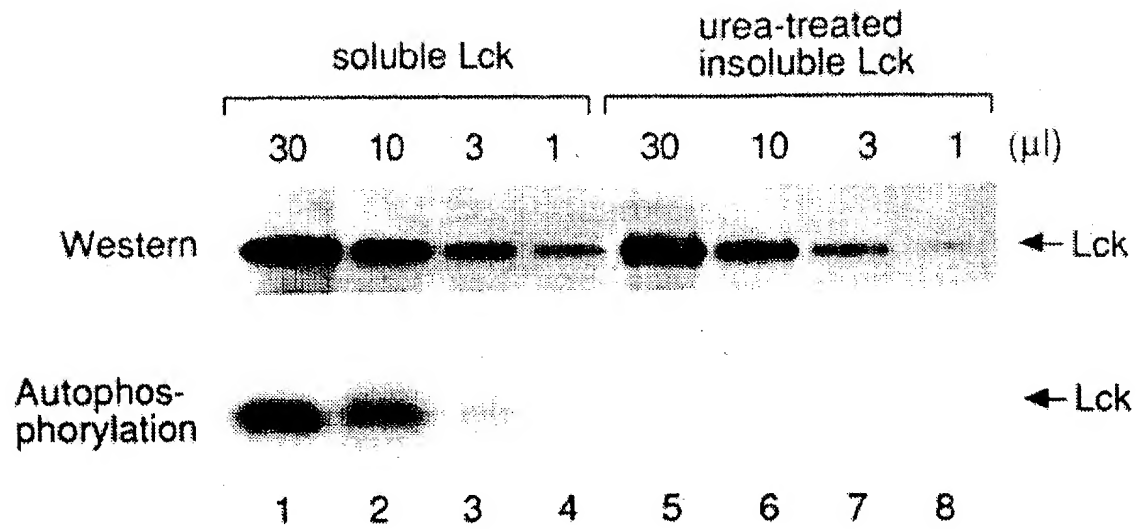
図面代用写真

【図 4】

## 写真用代用面図



【図5】



図面代用写真

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 R    1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所